

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle**  
Bureau international



**(43) Date de la publication internationale**  
**29 septembre 2005 (29.09.2005)**

**PCT**

**(10) Numéro de publication internationale**  
**WO 2005/090551 A1**

- 
- (51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C12N 1/02,** C12M 1/12, A23L 1/30
- (21) Numéro de la demande internationale :** PCT/FR2005/000478
- (22) Date de dépôt international :** 28 février 2005 (28.02.2005)
- (25) Langue de dépôt :** français
- (26) Langue de publication :** français
- (30) Données relatives à la priorité :** 0401997 27 février 2004 (27.02.2004) FR
- (71) Déposant (pour tous les États désignés sauf US) : COM-PAGNIE GERVAIS DANONE [FR/FR]; 126-130, rue Jules Guesde, F-92300 Levallois-Perret (FR).**
- (72) Inventeurs; et**
- (75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : TER-RAGNO, Luc [FR/FR]; 16, boulevard de Clichy, F-75018 Paris (FR). CATONNET, Guillaume [FR/FR]; 34, rue Jean Rostand, F-91300 Massy (FR). REGULIER, Pascal [FR/FR]; 24, Chemin de l'aqueduc, F-78280 Guyancourt (FR). DAVAL, Christophe [FR/FR]; 6 avenue de Villeneuve Saint Georges, F-94600 Choisy le Roi (FR). TEISSIER, Philippe [FR/FR]; 16 Bis, rue Suzanne, F-91300 Massy (FR). BARBEAU, Jean-Yves [FR/FR]; 35 Bis, rue Pierre Brossolette, F-91430 Igny (FR).**
- (74) Mandataires : MARTIN, Jean-Jacques etc.; Cabinet Régimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).**

**(81) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible) :** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

**(84) États désignés (sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible) :** ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Déclaration en vertu de la règle 4.17 :**

- relative à la qualité d'inventeur (règle 4.17.iv)) pour US seulement

**Publiée :**

- avec rapport de recherche internationale
- avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si des modifications sont reçues

*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.*

WO 2005/090551 A1

---

**(54) Title:** LIQUID CONCENTRATE OF BACTERIA THAT ARE ADAPTED AND FIT FOR ALIMENTARY USE

**(54) Titre :** CONCENTRAT LIQUIDE DE BACTERIES ADAPTEES ET VIABLES POUR UN USAGE ALIMENTAIRE

**(57) Abstract:** The invention relates to a liquid concentrate of bacteria that are adapted and fit for alimentary use. In a preferred but not limited manner, the bacteria produced are lactic bacteria.

**(57) Abrégé :** La présente invention concerne un concentrat liquide de bactéries adaptées et viables pour un usage alimentaire. De manière préférentielle mais non limitative, les bactéries produites sont des bactéries lactiques.

**CONCENTRAT LIQUIDE DE BACTERIES ADAPTEES ET VIABLES POUR  
UN USAGE ALIMENTAIRE.**

5        La présente invention concerne un concentrat liquide de bactéries adaptées et viables pour un usage alimentaire. De manière préférentielle mais non limitative, les bactéries produites sont des bactéries lactiques.

L'ingestion de certaines souches de bactéries, en particulier celles qui appartiennent aux genres *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* sont particulièrement bénéfiques au niveau de la santé, notamment en favorisant un bon fonctionnement de la flore intestinale. En effet, ces bactéries produisent des bactériocines et de l'acide lactique qui augmentent la digestibilité des aliments, favorisent le péristaltisme intestinal, et accélèrent l'évacuation des selles. De plus, ces bactéries produisent certaines vitamines du complexe B, et favorisent en général l'absorption des vitamines et minéraux, diminuent le cholestérol sanguin, renforcent le système immunitaire et tapisse les muqueuses intestinales afin de protéger contre l'invasion et les activités des microorganismes nuisibles.

De ce fait, depuis plusieurs années, les industries agroalimentaires tentent d'incorporer de telles bactéries dans leurs produits finaux, le plus généralement des yaourts.

Actuellement, ces bactéries sont utilisées sous une forme congelée ou lyophilisée. Cependant, ces processus de production sont traumatisants pour les bactéries qui perdent une partie de leur activité et parfois leur viabilité. Cela est préjudiciable pour les industriels producteurs et pour les consommateurs de ces produits car les bactéries doivent satisfaire aux exigences de qualité et de performances technologiques, si possible pendant plusieurs mois. Il serait donc souhaitable d'utiliser des bactéries produites par un procédé leur assurant une viabilité et une activité maximale. A cet effet, une méthode consiste à produire les bactéries sous une forme liquide. Cependant il a été mis en évidence que cette méthode génère également une mortalité importante des bactéries, après l'introduction des bactéries dans le produit final.

En outre, pour diminuer les coûts de stockage des bactéries et faciliter l'adjonction des bactéries dans le produit final, il serait souhaitable de concentrer les bactéries sous forme liquide. Pour cela, l'homme du métier utilise de manière habituelle une étape de centrifugation ou de filtration. Cependant, la centrifugation est un processus traumatisant pour les bactéries qui peut entraîner une forte mortalité cellulaire notamment due à un fort cisaillement et de plus, ce procédé n'est pas bien adapté pour la centrifugation de faibles volumes tels que ceux requis dans la production de bactéries destinées à être additionnées en tant que probiotique à des produits alimentaires. Concernant une étape de filtration classique, celle-ci pose également des problèmes de mortalité des bactéries et de colmatage des filtres par les bactéries.

Il serait donc souhaitable de produire un volume souhaité de concentrat liquide de bactéries qui présentent une activité et une viabilité maximale après l'étape de concentration et après l'introduction dans le produit final.

De manière surprenante et inattendue, les inventeurs ont montré qu'une étape d'adaptation des bactéries permettait d'augmenter de manière significative l'activité et la viabilité des bactéries après l'introduction dans le produit final.

De plus, les inventeurs ont montré qu'une étape de filtration tangentielle, sous certaines conditions particulières (pression, concentration, porosité de membrane, etc), permettait de concentrer de gros volumes de culture de bactéries, tout en préservant leur viabilité et sans colmatage des filtres.

La filtration tangentielle permet de produire deux courants en fonction de la nature et de la structure de la membrane : le perméat (le milieu de culture sensiblement exempt de bactéries) et le rétentat (contenant les bactéries, appelé aussi concentrat). Dans une filtration tangentielle, le fluide circule non pas perpendiculairement mais parallèlement à la surface de la membrane et assure ainsi par sa vitesse d'écoulement un auto nettoyage qui prévient l'accumulation de dépôts qui obturent la surface de filtration (appelé communément colmatage des filtres).

Un objet de la présente invention est donc un concentrat de bactéries caractérisé en ce que le concentrat est liquide et en ce que les bactéries sont adaptées, viables et à une concentration comprise entre  $5.10^{10}$  et  $5.10^{11}$  ufc/ml.

Par bactéries, on entend désigner préférentiellement selon la présente invention des bactéries lactiques, du genre *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Streptococcus spp.*, *Lactococcus spp.* et en particulier *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus helveticus*, 5 *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis*.

Par bactéries adaptées, on entend désigner, selon la présente invention, des bactéries plus résistantes à différents stress, en particulier liés à différents stress physicochimiques.

10 Par bactéries adaptées et viables, on entend désigner, selon la présente invention, des bactéries dont le taux de survie après 28 jours dans un produit alimentaire, en particulier un produit laitier ou une boisson, est supérieur à 60% et avantageusement supérieur à 80%.

La viabilité des bactéries est mesurée par des techniques de numération connue 15 de l'homme du métier comme par exemple la numération en masse, la numération en surface, les cellules de Malassez, le comptage direct, la turbidité, la néphéломétrie, le comptage électronique, la cytométrie en flux, la fluorescence, l'impédimétrie, l'analyse d'images.

Selon la présente invention, le concentrât est caractérisé en ce que les bactéries 20 adaptées présentent au moins l'une des caractéristiques suivantes quand elles sont ajoutées à un produit alimentaire :

- i) un taux de survie supérieur à 80% après 14 jours dans un produit alimentaire à une température comprise entre 4°C et 45°C, ledit produit alimentaire ayant un pH compris entre 3 et 7 ou
- 25 ii) un taux de survie supérieur à 60% et avantageusement supérieur à 80% après 28 jours dans un produit alimentaire à une température comprise entre 4°C et 45°C, ledit produit alimentaire ayant un pH compris entre 3 et 7.

Selon la présente invention, le concentrât est caractérisé en ce que les bactéries 30 présentent les deux caractéristiques i) et ii).

Selon la présente invention, le concentrât est caractérisé en ce que le produit alimentaire est un produit laitier et/ou une boisson.

Selon la présente invention, les bactéries du concentrât sont viables pendant une période comprise entre 4 et 6 semaines.

Selon la présente invention, le concentrât est caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par le procédé comprenant les étapes successives de 5 propagation des bactéries dans un milieu de culture, d'adaptation des bactéries, de lavage du milieu de culture contenant les bactéries adaptées par microfiltration tangentielle, et de concentration en bactéries du milieu lavé par microfiltration tangentielle.

Selon la présente invention, le milieu de culture de l'étape de propagation est un 10 milieu synthétique.

Par milieu synthétique, on entend désigner selon la présente invention un milieu dans lequel sont introduits des composants soumis à un contrôle quantitatif et qualitatif rigoureux.

Selon la présente invention, la solution utilisée à l'étape de lavage est adaptée à 15 l'utilisation alimentaire du concentrât de bactéries et présente une pression osmotique compatible avec la viabilité des bactéries.

Les inventeurs ont montré que l'étape d'adaptation des bactéries permet de réduire la mortalité de celles-ci, provoquée par le changement de milieu des bactéries entre leur milieu de culture et le produit alimentaire final à additiver.

Selon la présente invention l'adaptation des bactéries est mise en évidence par 20 la mesure de paramètres du milieu de culture des bactéries et/ou de paramètres des bactéries. Selon la présente invention, les paramètres du milieu de culture sont préférentiellement le pH, la pression osmotique et/ou la température.

D'autres paramètres du milieu de culture des bactéries pour la mise en évidence 25 de l'adaptation des bactéries sont possibles, comme par exemple la concentration en sucre du milieu bactérien.

Préférentiellement, dans le cas où le paramètre du milieu de culture est le pH, l'étape d'adaptation est réalisée par diminution du pH par acidification naturelle.

Afin d'effectuer l'étape d'adaptation des bactéries au pH par acidification 30 naturelle, on peut par exemple mesurer la concentration en sucre du milieu de fermentation et au-delà d'une concentration seuil pour chaque espèce de bactéries, on sait que le pH n'est plus régulé et l'adaptation au milieu devient très aisée.

Ainsi, par exemple, si la concentration en sucre du milieu de fermentation de *Lactobacillus casei* est de 9 g/L, le pH n'est plus régulé et est environ égal à 5. Il devient alors plus aisé pour la souche adaptée d'être ajoutée à un nouveau milieu et ceci permet une viabilité plus importante des bactéries dans le milieu final.

5 En outre, selon la présente invention, la filtration tangentielle peut être utilisée pour l'étape d'adaptation des bactéries.

Selon la présente invention la ou les membranes de filtration tangentielle sont d'une porosité comprise entre 0.01 et 0,5µm et de manière préférentielle, entre 0.1 et 0.3 µm.

10 Ces membranes sont utilisées pour les étapes de lavage et de concentration du procédé et éventuellement l'étape d'adaptation des bactéries.

Les membranes de filtration sont caractérisées par:

- la porosité et l'épaisseur de la couche filtrante dont dépend le débit de perméat.
- le diamètre des pores et leur répartition dont dépend l'efficacité de séparation.

15 - le matériau employé dont dépend la résistance mécanique, chimique, thermique et la facilité de nettoyage.

Par membrane de filtration, on entend désigner des membranes organiques ou minérales.

20 Les membranes organiques peuvent être composées entre autre d'acétate de cellulose, de polyamides aromatiques, de polysulfone, d'esters de cellulose, de cellulose, de nitrate de cellulose, de PVC, ou de Polypropylène.

Les membranes minérales peuvent être composées entre autre de céramique frittée, de métal fritté, de carbone, ou de verre.

Selon la présente invention, le paramètre des bactéries est la taille des bactéries.

25 Préférentiellement, dans le cas où l'adaptation est mise en évidence par la taille des bactéries, la distribution des longueurs de chaque bactérie dudit concentrât se situe majoritairement entre 0,1 et 10 micromètres, avantageusement entre 0,5 et 5 micromètres.

La mesure de la taille des bactéries se fait par un moyen adapté.

30 Un moyen adapté peut être par exemple un prélèvement régulier de bactéries suivi d'une mesure de la taille des bactéries par cytométrie de flux.

Selon la présente invention, le pH du concentrât est compris entre 3 et 6.

Selon la présente invention, la température d'utilisation du concentrat est comprise entre 25 et 45°C et préférentiellement entre 35 et 39°C.

Par température d'utilisation, on entend désigner selon la présente invention la température du concentrat quand il est ajouté à un produit alimentaire.

5 Selon la présente invention, le concentrat est conditionné dans des poches souples, hermétiques et stériles.

Par poches souples et hermétiques, on entend désigner, selon la présente invention et de manière préférentielle, des poches en plastique alimentaire.

10 Selon la présente invention, le concentrat, conditionné en poches souples hermétiques, peut être conservé à une température comprise entre -50°C et 4°C après conditionnement.

15 De manière optionnelle, il est possible de rajouter au concentrat liquide de bactéries adaptées et viables conditionné en poches souples et hermétiques, et conservé à des températures basses, des molécules cryoprotectrices telles que le saccharose par exemple.

Selon la présente invention, le concentrat, conditionné en poches souples et hermétiques, conservé à une température comprise entre -50°C et 4°C, est réchauffé jusqu'à une température comprise entre 25°C et 45°C, avantageusement entre 35 et 39°C par un moyen adapté avant d'être utilisé.

20 Par moyen adapté, on entend désigner selon la présente invention par exemple l'utilisation d'un bain marie à une température non létale pour les bactéries, par exemple 37°C.

25 Un objet de la présente invention est également l'utilisation du concentrat liquide de bactéries adaptées et viables, selon la présente invention en tant qu'additif alimentaire.

Par additif alimentaire, on entend désigner selon la présente invention toute substance chimique ajoutée aux aliments durant leur préparation ou en vue de leur entreposage pour obtenir un effet technique désiré. De plus, selon la présente invention, le concentrat liquide de bactéries possède une numération stable, les 30 bactéries étant viables et n'effectuant pas de fermentation dans le produit final additivé.

Un objet de la présente invention est également un produit alimentaire additivé, caractérisé en ce que l'additif alimentaire utilisé est le concentrat liquide de bactéries adaptées et viables selon la présente invention.

Selon la présente invention, le produit alimentaire est un produit laitier et/ou une  
5 boisson.

Par produit laitier on entend désigner selon la présente invention, en plus du lait, les produits dérivés du lait, tels la crème, la crème glacée, le beurre, le fromage, le yaourt; les produits secondaires, comme le lactosérum, la caséine ainsi que divers aliments préparés contenant comme ingrédient principal du lait ou des constituants du  
10 lait.

Par boisson on entend désigner selon la présente invention des boissons comme par exemple les jus de fruits, les mélanges de lait et de jus de fruits, les jus végétaux tels que par exemple le jus de soja, le jus d'avoine ou le jus de riz, les boissons alcoolisées comme par exemple le kéfir, les sodas, et les eaux de source ou minérales  
15 additionnées ou non de sucre ou d'arômes par exemple.

Un objet de la présente invention est également un procédé de fabrication d'un produit alimentaire additivé selon la présente invention, caractérisé en ce que le concentrat liquide de bactéries adaptées et viables est additionné au produit alimentaire en fin de ligne de production et préférentiellement avant le conditionnement du produit  
20 alimentaire.

Selon la présente invention, le procédé de fabrication d'un produit alimentaire additivé est caractérisé en ce que le concentrat liquide de bactéries adaptées et viables est additionné au produit alimentaire en ligne par pompage.

25 La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mesure de la viabilité et de l'adaptation des bactéries du concentrat liquide selon la présente invention.

Il va de soi, toutefois que ces exemples ne sont donnés qu'à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne sauraient constituer en aucune manière une  
30 limitation.

Légende des figures :

Figure 1 : Suivi de la viabilité de souches de *Lactobacillus casei* adaptées et non adaptées dans un produit alimentaire de type yaourt sur une période de 28 jours.

5

Figure 2a : Histogramme de distribution de taille de souches de *Lactobacillus casei* adaptées et non adaptées avant d'être soumises à un stress acide.

10

Figure 2b : Histogramme de distribution de taille de souches de *Lactobacillus casei* adaptées et non adaptées après être soumises à un stress acide

15

Figure 3 : Courbes montrant l'adaptation de *Lactobacillus casei* par rapport à la température du milieu de culture (37°C et 39°C). La permittivité relative  $\epsilon_R$  (quantité adimensionnelle égale à la permittivité  $\epsilon$ , exprimée en pF/cm, divisée par la permittivité du vide  $\epsilon_0$ ) est exprimée en fonction de l'age des bactéries (en heures)

20

Figure 4 : Courbes montrant l'adaptation de *Lactobacillus casei* en fonction de la pression osmotique (concentration en glucose de 20, 40 et 80 g/L, respectivement en gris clair, gris foncé et noir). La permittivité  $\epsilon$ , exprimée en pF/cm, est exprimée en fonction de la Densité Optique (DO).

#### EXEMPLES :

25

\* Exemple 1 : Conséquences de l'adaptation de souches de *L. casei* sur leur viabilité.

On souhaite évaluer les conséquences d'une étape d'adaptation de souches de *Lactobacillus casei* au niveau de leur viabilité.

30

Pour cela, on prépare un lot de bactéries témoin de *Lactobacillus casei* qui sont mises en culture dans un milieu MRS (milieu spécial permettant la croissance des lactobacilles, mis au point par Man, de Rogosa et Sharpe).

En parallèle à ce lot témoin, on prépare un lot de bactéries *Lactobacillus casei*, qui après la mise en culture dans un milieu MRS sont adaptées par une étape d'acidification naturelle.

5 Pour cela, après 17 heures de culture, une diminution du pH est réalisée par acidification naturelle sur une heure pour passer de pH 6,5 à pH 5.

Ensuite, les deux lots de bactéries sont lavés et concentrés en bactéries par microfiltration tangentielle.

Ces deux concentrâts de bactéries sont introduits séparément dans une masse de yaourt à pH 5,5 et à une température de 10°C.

10 On mesure la quantité de bactéries vivantes à J+ 1 dans les deux lots de yaourt.

On prélève ensuite tous les jours un échantillon des deux lots de yaourt additionné respectivement du concentrât bactérien témoin et du concentrât de bactéries adaptées, et on quantifie le nombre de souches survivantes par rapport au nombre de souches vivantes à J+1. Pour cela, on effectue une numération en masse.

15 Pour chacune des mesures de viabilité durant la période de conservation du produit fini, ce dernier est bien homogénéisé avant le prélèvement. Un prélèvement stérile de 1 ml de produit est réalisé. Une dilution seriée de 10 en 10 est effectuée. Les différentes dilutions du produit sont placées dans une boite de Petri et un milieu gélosé liquide (puisque préalablement chauffé à 50°C) est coulé sur ces fractions du produit.

20 On choisira le milieu à couler en fonction de la nature des bactéries que l'on souhaite compter. Le milieu gélosé durcit. Les boites de Petri sont alors placées en incubation pendant quelques jours (2-5j) à 37°C. Les résultats sont illustrés par la figure 1.

25 On observe qu'au bout de 7 jours, le nombre de bactéries survivantes dans le lot des bactéries témoin est de 80% et dans le lot de bactéries adaptées de 105% (il y a eu une légère croissance bactérienne).

Au bout de 14 jours, le nombre de bactéries survivantes dans le lot des bactéries témoin est de 58% et dans le lot de bactéries adaptées de 110% (il y a eu une légère croissance bactérienne).

30 Au bout de 28 jours, le nombre de bactéries survivantes dans le lot des bactéries témoin est de 42% et dans le lot de bactéries adaptées de 110% (il y a eu une légère croissance bactérienne).

En conclusion, l'étape d'adaptation des bactéries induit une diminution de la mortalité des bactéries de l'ordre de 60 % par rapport à un lot témoin de bactéries non adaptées, après 28 jours dans un yaourt.

5

\* Exemple 2 : Evolution de la taille de bactéries adaptées et de bactéries non adaptées soumises à un stress acide.

On souhaite suivre l'évolution de la taille de bactéries adaptées et de bactéries  
10 non adaptées soumises à un stress acide.

Pour cela, on prépare un lot de bactéries témoin de *Lactobacillus casei* qui sont mises en culture dans un milieu MRS (milieu spécial permettant la croissance des lactobacilles, mis au point par Man, de Rogosa et Sharpe).

En parallèle à ce lot témoin, on prépare un lot de bactéries *Lactobacillus casei*,  
15 qui après la mise en culture dans un milieu MRS sont adaptées par une étape d'acidification naturelle.

Pour cela, après 17 heures de culture, une descente du pH est réalisée par acidification naturelle sur une heure pour passer de pH 6,5 à pH 5.

Ensuite, les deux lots de bactéries sont lavés et concentrés en bactéries par  
20 microfiltration tangentielle.

On effectue ensuite un prélèvement de bactéries et l'on mesure leur taille par cytométrie de flux. On établit ainsi un histogramme de distribution de taille des bactéries adaptées et non adaptées (lot témoin) (figure 2a). On observe que la distribution de taille des bactéries des deux lots est très similaire.

25 Ensuite, les deux lots de bactéries sont soumis à un stress acide par ajout des bactéries à un milieu ayant un pH de 3.

On effectue ensuite un prélèvement de bactéries et l'on mesure leur taille par cytométrie de flux. On établit ainsi un histogramme de distribution de taille des bactéries adaptées et non adaptées après un stress acide (figure 2b). On observe que la  
30 distribution de taille des bactéries des deux lots est très différente. Dans le lot de bactéries adaptées, la taille de fréquence la plus importante est de 3,2 µm (fréquence

de 0.016). Dans le lot de bactéries non adaptées, la taille de fréquence la plus importante est de 5.45 µm (fréquence de 0.012).

En conclusion, l'étape d'adaptation des bactéries induit une diminution de la taille des bactéries de l'ordre de 60% lorsque celles-ci sont soumises à un stress acide, 5 par rapport à des bactéries non adaptées. Il est donc possible de mettre en évidence l'adaptation des bactéries par la mesure de leur taille.

\* Exemple 3 : Mise en évidence de l'adaptation des bactéries par la mesure de l'influence du paramètre « température » du milieu de culture

10

On souhaite mettre en évidence l'adaptation des bactéries en mesurant l'influence du paramètre du milieu de culture qu'est la température.

Pour cela, on prépare deux lots de bactéries de *Lactobacillus casei* à partir d'un même inoculum. Ces deux lots sont mis en culture dans deux milieux MRS (milieu 15 spécial permettant la croissance des Lactobacilles, mis au point par Man, de Rogosa et Sharpe).

Une sonde de biomasse permettant de mesurer la permittivité relative  $\epsilon_R$  est utilisée. Les sondes utilisables à cette fin sont connues de l'homme du métier (voir notamment FR2835921). La permittivité relative  $\epsilon_R$  est une quantité adimensionnelle 20 égale à la permittivité  $\epsilon$  (exprimée en pF/cm) divisée par la permittivité du vide  $\epsilon_0$  ( $\epsilon_0 = 8,854187 \cdot 10^{-2}$  pF/cm). L'évolution de la permittivité relative est mesurée au cours du temps. La permittivité relative sera fonction du nombre de cellules vivantes et de la taille de ces cellules.

Les deux milieux de culture rigoureusement identiques et comportant la même 25 quantité de bactéries sont cultivés l'un à 37°C et l'autre à 39°C.

La quantité de souches augmente au cours du temps, ce qui est normal.

Les inventeurs ont pu vérifier que le nombre de cellules total n'était pas différent dans les deux milieux de culture. Une technique classique de mesure de densité optique (du type spectromètre d'absorbance) peut être utilisée à cette fin ou bien une 30 sonde optique Wedgewood (système mesurant dans le proche infrarouge la densité optique de suspensions microbiennes). L'absorbance du milieu mesurée par un

spectromètre sera fonction de la quantité de cellules totale dans le milieu. Des techniques de dénombrement sur boîte peuvent aussi être utilisées.

Grâce à la sonde de biomasse utilisée, il a pu être mis en évidence que les bactéries changeaient de forme et de taille, donc s'adaptait en fonction de la 5 température du milieu de culture. La Figure 3 illustre cette observation.

\* Exemple 4 : Mise en évidence de l'adaptation des bactéries par la mesure de l'influence des paramètres « température » et « pH » du milieu de culture.

10 On souhaite mettre en évidence l'adaptation des bactéries en mesurant l'influence de deux paramètres du milieu de culture pris conjointement que sont la température et le pH.

Pour cela, on prépare trois lots de bactéries de *Lactobacillus casei* à partir d'un même inoculum.

15 On cultivera les trois milieux de culture à trois températures différentes (35, 37 et 39°C) tout en soumettant à chaque fois les bactéries à un stress acide en abaissant le pH du milieu à un pH de 3.

Le changement de taille des cellules traduira leur adaptation aux conditions du milieu. Cette taille sera mesurée par microscopie.

20 Dans le Tableau 1, les résultats obtenus montrent bien que les bactéries s'adaptent en fonction des paramètres du milieu que sont la température et le pH puisque ces bactéries changent de taille.

Tableau 1 : Influence de la température et du pH sur la taille des bactéries  
25 (exprimés en µm)

Température (°C)	Taille moyenne des bactéries pendant la préculture	Taille moyenne des bactéries avant changement de pH	Taille moyenne des bactéries après changement de pH
35	3	3	2
37	4	5	4
39	3	7	5

\* Exemple 5 : Mise en évidence de l'adaptation des bactéries par la mesure de l'influence du paramètre « pression osmotique » du milieu de culture.

On souhaite mettre en évidence l'adaptation des bactéries en mesurant  
5 l'influence du paramètre du milieu de culture qu'est la pression osmotique.

Pour cela, on prépare trois lots de bactéries de *Lactobacillus casei* à partir d'un même inoculum. Ces lots sont mis en culture dans un milieu MRS (milieu spécial permettant la croissance des *Lactobacilles*, mis au point par Man, de Rogosa et Sharpe).

10 Les trois milieux de culture comportant la même quantité de bactéries contiendront respectivement des quantités de 20, 40 et 80 g de glucose par litre de milieu de culture. Plus la concentration en glucose du milieu est élevée, plus la pression osmotique de ce milieu est élevée.

Une sonde permettant de mesurer la permittivité relative est utilisée. Les sondes  
15 utilisables à cette fin sont connues de l'homme du métier (FR2835921). L'évolution de cette permittivité relative au cours du temps est mesurée. La permittivité  $\epsilon$  (exprimée en pF/cm) est calculée en multipliant la permittivité relative  $\epsilon_R$  mesurée par la permittivité du vide  $\epsilon_0$  ( $\epsilon_0 = 8,854\,187 \cdot 10^{-2}$  pF/cm).

Une technique classique de mesure de densité optique (du type spectromètre  
20 d'absorbance), ou bien une sonde optique Wedgewood (système mesurant dans le proche infra-rouge la densité optique de suspensions microbiennes), est utilisée pour mesurer l'évolution de la densité optique du milieu au cours du temps. La valeur de Densité Optique (DO) obtenue sera fonction du nombre de cellules total dans le milieu.

En exprimant la permittivité en fonction de la DO, la courbe résultante (Figure 4)  
25 permet de mettre en évidence l'évolution de la viabilité (exprimée par la mesure de la permittivité) et de la taille des cellules en fonction de la pression osmotique du milieu. Les résultats montrent que les bactéries changent de taille. En effet, dans le cas où il n'y aurait pas ce changement de taille des cellules, les résultats observés sur la Figure 4 seraient des droites rectilignes. Dans le cas présent, on peut observer des courbes  
30 (corrélation non linéaire).

Les bactéries s'adaptent donc en fonction de la pression osmotique du milieu de culture.

## Revendications

1. Concentrât de bactéries caractérisé en ce que le concentrât est liquide et en ce que les bactéries sont adaptées, viables et à une concentration comprise entre  $5.10^{10}$  et 5  $5.10^{11}$  ufc/ml, lesdites bactéries adaptées étant plus résistantes à différents stress, en particulier liés à différents stress physicochimiques
2. Concentrât selon la revendication 1 caractérisé en ce que les bactéries sont des bactéries lactiques, en particulier des bactéries du genre *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.* *Streptococcus spp.* et *Lactococcus spp.*
3. Concentrât selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que les bactéries adaptées présentent au moins l'une des caractéristiques suivantes quand elles sont ajoutées à un produit alimentaire :
  - 15 i) un taux de survie supérieur à 80% après 14 jours dans un produit alimentaire à une température comprise entre 4°C et 45°C, ledit produit alimentaire ayant un pH compris entre 3 et 7 ou
  - ii) un taux de survie supérieur à 60% et avantageusement supérieur à 80% après 28 jours dans un produit alimentaire à une température comprise entre 4°C et 45°C, ledit produit alimentaire ayant un pH compris entre 3 et 7.
4. Concentrât selon la revendication 3 caractérisé en ce que les bactéries présentent les deux caractéristiques i) et ii).
- 25 5. Concentrât selon l'une quelconque des revendications 3 à 4 caractérisé en ce que le produit alimentaire est un produit laitier et/ou une boisson.
6. Concentrât selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que les bactéries sont viables pendant une période comprise entre 4 et 6 semaines.

7. Concentrât selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce qu'il est susceptible d'être obtenu par le procédé comprenant les étapes successives de propagation des bactéries dans un milieu de culture, d'adaptation des bactéries, de lavage du milieu de culture contenant les bactéries adaptées par microfiltration tangentielle, et de concentration en bactéries du milieu lavé par microfiltration tangentielle.  
5
8. Concentrât selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce que l'adaptation des bactéries est mise en évidence par la mesure de paramètres du milieu de culture des bactéries et/ou de paramètres des bactéries.  
10
9. Concentrât selon la revendication 8, caractérisé en ce que les paramètres du milieu de culture sont le pH, la pression osmotique, et/ou la température.
- 15 10. Concentrât selon la revendication 9 caractérisé en ce que le paramètre du milieu de culture est le pH et que l'étape d'adaptation est réalisée par diminution du pH par acidification naturelle.
11. Concentrât selon les revendications 1 à 10 caractérisé en ce que les bactéries sont  
20 adaptées par un procédé de microfiltration tangentielle.
12. Concentrât selon l'une quelconque des revendications 8 à 11, caractérisé en ce que le paramètre des bactéries est la taille des bactéries.
- 25 13. Concentrât selon la revendication 12 caractérisé en ce que la distribution des longueurs de chaque bactérie dudit concentrât se situe majoritairement entre 0,1 et 10 micromètres, avantageusement entre 0,5 et 5 micromètres.
14. Concentrât selon l'une quelconque des revendications précédentes caractérisé en ce  
30 que son pH est compris entre 3 et 6.

15. Concentrât selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 caractérisé en ce qu'il est conservé à une température comprise entre -50°C à +4°C après conditionnement.
- 5     16. Concentrât selon la revendication 15 caractérisé en ce qu'il est réchauffé jusqu'à une température comprise entre 25 et 45°C, avantageusement entre 35 et 39°C par un moyen adapté avant d'être utilisé.
- 10    17. Utilisation du concentrât selon l'une quelconque des revendications 1 à 16 en tant qu'additif alimentaire.
18. Utilisation du concentrât selon l'une quelconque des revendications 1 à 16, à une température comprise entre 25 et 45°C, avantageusement entre 35 et 39°C.
- 15    19. Récipient sous la forme de poches souples, hermétiques et stériles comprenant le concentrât selon l'une quelconque des revendications 1 à 16.
- 20    20. Produit alimentaire additivé, caractérisé en ce que l'additif alimentaire utilisé est un concentrât liquide de bactéries adaptées et viables selon l'une quelconque des revendications 1 à 16.
- 25    21. Produit alimentaire additivé selon la revendication 20, caractérisé en ce qu'il s'agit d'un produit laitier et/ou d'une boisson.
- 30    22. Procédé de fabrication d'un produit alimentaire additivé selon l'une quelconque des revendications 20 à 21, caractérisé en ce que le concentrât liquide de bactéries adaptées et viables est additionné au produit alimentaire en fin de ligne de production et avantageusement avant le conditionnement du produit alimentaire.
- 30    23. Procédé de fabrication d'un produit alimentaire additivé selon la revendication 22, caractérisé en ce que le concentrât liquide de bactéries adaptées et viables est additionné au produit alimentaire en ligne par pompage.

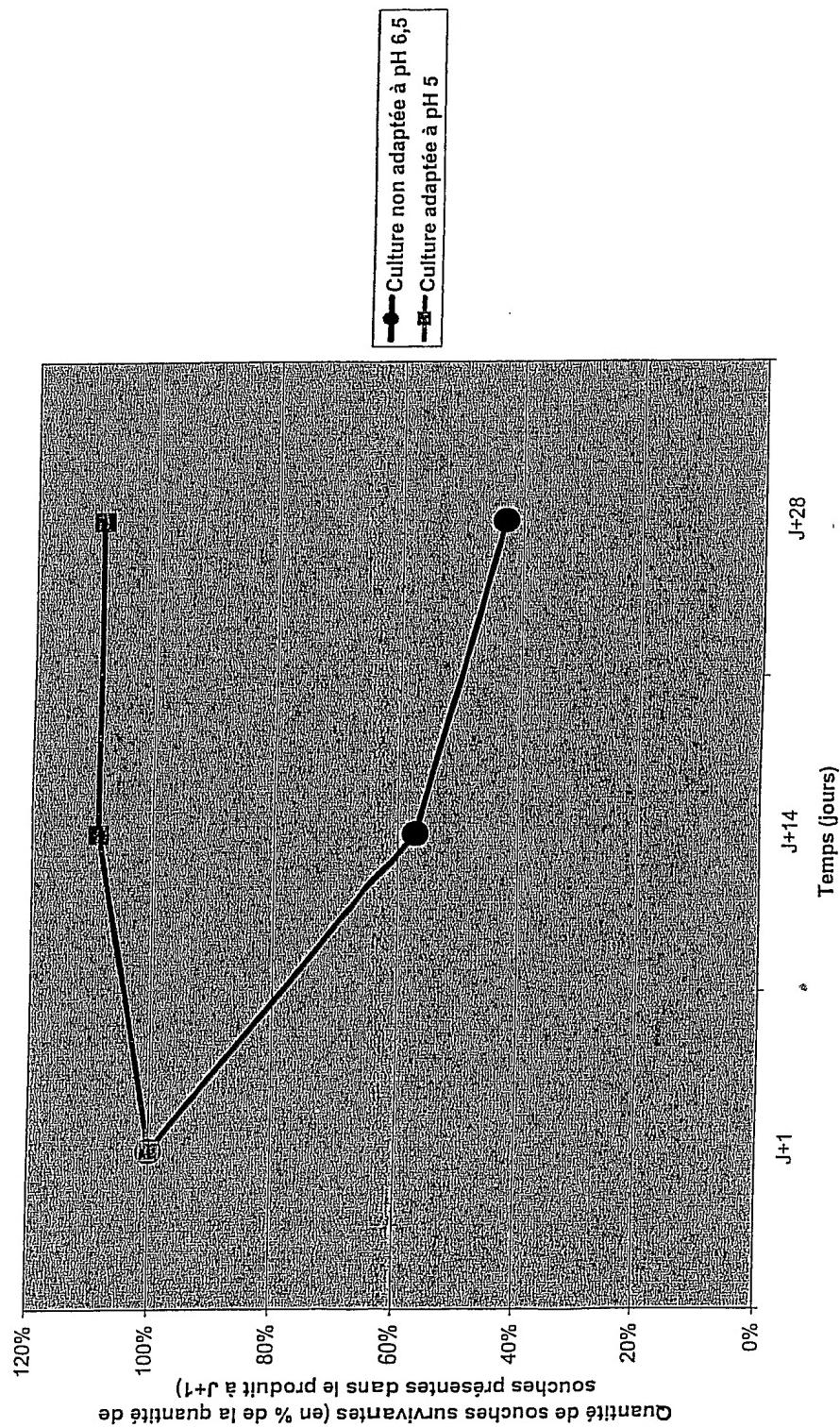


Figure 1

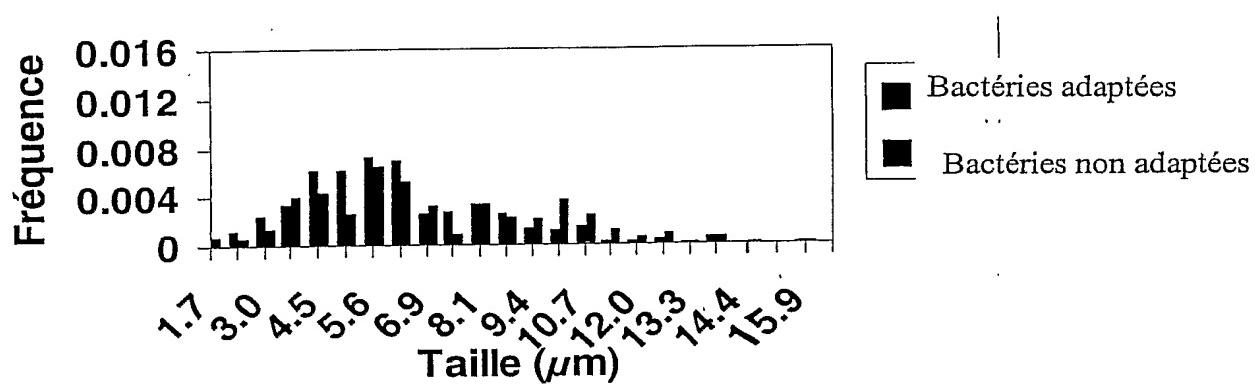


Figure 2a

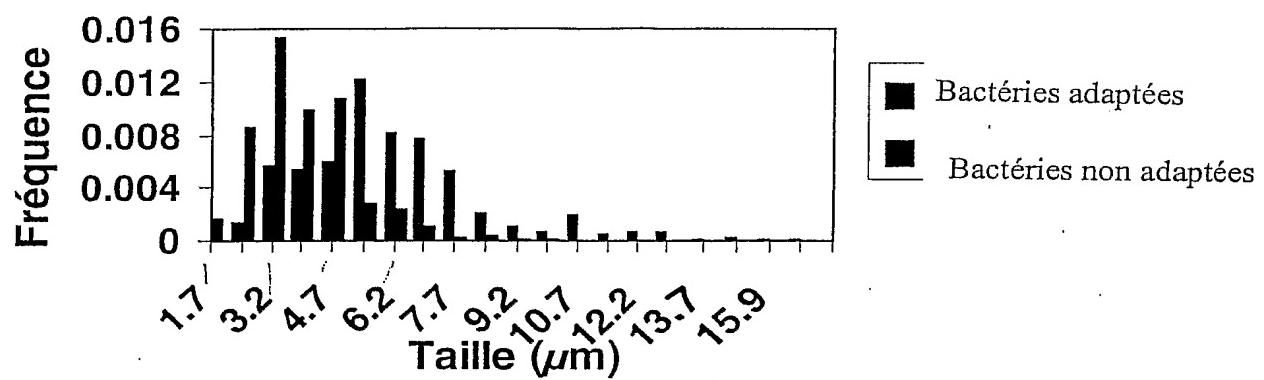


Figure 2b

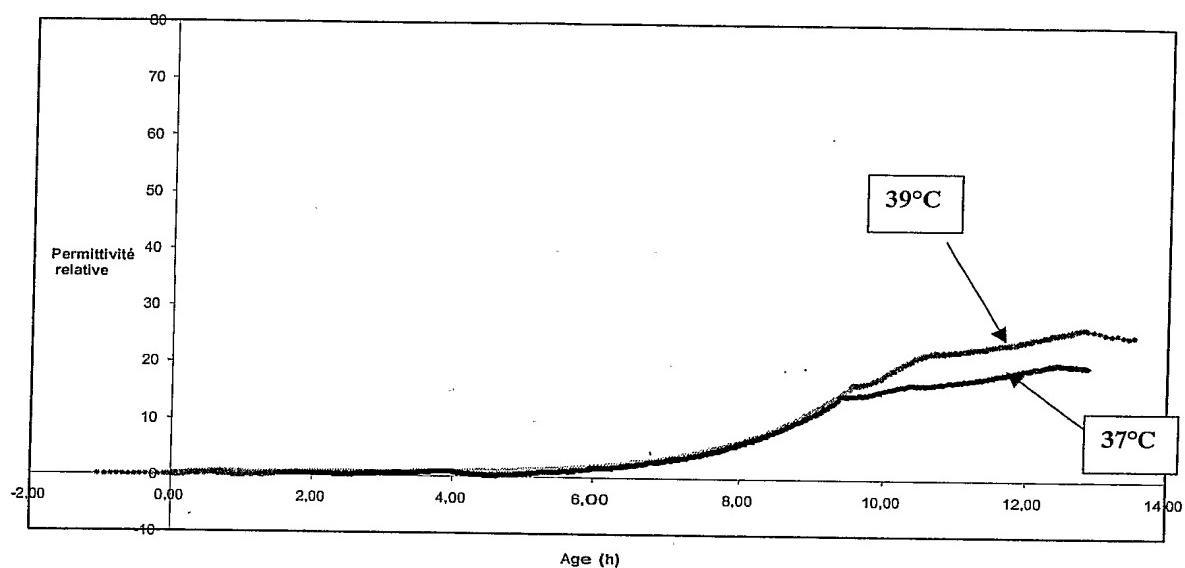


Figure 3

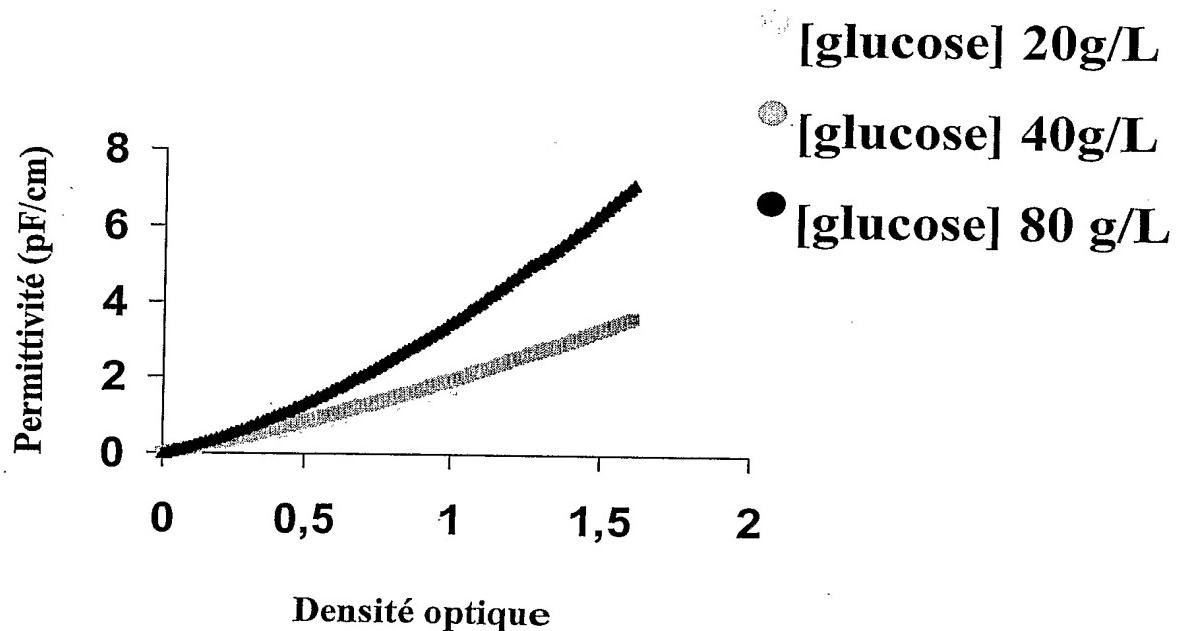


Figure 4

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2005/000478

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
 IPC 7 C12N1/02 C12M1/12 A23L1/30

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
 IPC 7 C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>SHAH N P: "Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods." JOURNAL OF DAIRY SCIENCE. APR 2000, vol. 83, no. 4, April 2000 (2000-04), pages 894-907, XP002299123          ISSN: 0022-0302          Document en entier et en particulier pages 902-903</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1-23

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

° Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 June 2005

Date of mailing of the international search report

15/07/2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ury, A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2005/000478

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MARGOLLES ABELARDO ET AL: "Characterisation of a Bifidobacterium strain with acquired resistance to cholate--a preliminary study." INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY. 25 APR 2003, vol. 82, no. 2, 25 April 2003 (2003-04-25), pages 191-198, XP002299124 ISSN: 0168-1605 the whole document -----	1-23
Y	KIM W S ET AL: "Assessment of stress response of the probiotic Lactobacillus acidophilus." CURRENT MICROBIOLOGY. NOV 2001, vol. 43, no. 5, November 2001 (2001-11), pages 346-350, XP002299125 ISSN: 0343-8651 the whole document -----	1-23
Y	CRESPO J P S G ET AL: "TANGENTIAL FLOW FILTRATION FOR CONTINUOUS CELL RECYCLE CULTURE OF ACIDOGENIC BACTERIA" CHEMICAL ENGINEERING SCIENCE, OXFORD, GB, vol. 47, no. 1, 1992, pages 205-214, XP009034901 ISSN: 0009-2509 page 205 page 213 -----	1-23
Y	CARIDIS K A ET AL: "Pressure effects in cross-flow microfiltration of suspensions of whole bacterial cells" BIOPROCESS ENGINEERING, vol. 16, no. 4, 1997, pages 199-208, XP002299126 ISSN: 0178-515X page 199 -----	1-23
Y	TANNY G B ET AL: "IMPROVED FILTRATION TECHNIQUE FOR CONCENTRATING AND HARVESTING BACTERIA" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 40, no. 2, 1980, pages 269-273, XP009037575 ISSN: 0099-2240 abstract ----- -/-	1-23

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/FR2005/000478

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	REID D E ET AL: "LARGE-SCALE HARVESTING AND CONCENTRATION OF BACTERIA BY TANGENTIAL FLOW FILTRATION" JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, vol. 41, no. 2, 1976, pages 321-324, XP009037592 ISSN: 0021-8847 abstract -----	1-23

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR2005/000478

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 C12N1/02 C12M1/12 A23L1/30

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	<p>SHAH N P: "Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods." JOURNAL OF DAIRY SCIENCE. APR 2000, vol. 83, no. 4, avril 2000 (2000-04), pages 894-907, XP002299123 ISSN: 0022-0302 Document en entier et en particulier pages 902-903</p> <p>-----</p> <p>-/-</p>	1-23

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- \*A\* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- \*E\* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- \*L\* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- \*O\* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- \*P\* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- \*T\* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- \*X\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- \*Y\* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- \*&\* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

22 juin 2005

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

15/07/2005

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale  
Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ury, A

## RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No  
PCT/FR2005/000478

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	MARGOLLES ABELARDO ET AL: "Characterisation of a Bifidobacterium strain with acquired resistance to cholate--a preliminary study." INTERNATIONAL JOURNAL OF FOOD MICROBIOLOGY. 25 APR 2003, vol. 82, no. 2, 25 avril 2003 (2003-04-25), pages 191-198, XP002299124 ISSN: 0168-1605 le document en entier -----	1-23
Y	KIM W S ET AL: "Assessment of stress response of the probiotic Lactobacillus acidophilus." CURRENT MICROBIOLOGY. NOV 2001, vol. 43, no. 5, novembre 2001 (2001-11), pages 346-350, XP002299125 ISSN: 0343-8651 le document en entier -----	1-23
Y	CRESPO J P S G ET AL: "TANGENTIAL FLOW FILTRATION FOR CONTINUOUS CELL RECYCLE CULTURE OF ACIDOGENIC BACTERIA" CHEMICAL ENGINEERING SCIENCE, OXFORD, GB, vol. 47, no. 1, 1992, pages 205-214, XP009034901 ISSN: 0009-2509 page 205 page 213 -----	1-23
Y	CARIDIS K A ET AL: "Pressure effects in cross-flow microfiltration of suspensions of whole bacterial cells" BIOPROCESS ENGINEERING, vol. 16, no. 4, 1997, pages 199-208, XP002299126 ISSN: 0178-515X page 199 -----	1-23
Y	TANNY G B ET AL: "IMPROVED FILTRATION TECHNIQUE FOR CONCENTRATING AND HARVESTING BACTERIA" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, vol. 40, no. 2, 1980, pages 269-273, XP009037575 ISSN: 0099-2240 abrégué ----- -/-	1-23

**RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE**Demande Internationale No  
PCT/FR2005/000478**C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS**

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
Y	REID D E ET AL: "LARGE-SCALE HARVESTING AND CONCENTRATION OF BACTERIA BY TANGENTIAL FLOW FILTRATION" JOURNAL OF APPLIED BACTERIOLOGY, vol. 41, no. 2, 1976, pages 321-324, XP009037592 ISSN: 0021-8847 abrégué -----	1-23